

## **Assessment of genetic diversity and population structure among some tomato (*Solanum lycopersicum*) genotypes using ISSR markers**

**Maryam Nazari**

Ph.D. Student, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail: nazary.maryam.1378@gmail.com

**Azam Nikbakht-Dehkordi** 

\*Corresponding author. Assistant Professor, Research and Technology Institute of Plant Production, Afzalipour Research Institute, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail: anikbakht@uk.ac.ir

**Ghasem Mohammadi-Nejad** 

Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail: mohammadinejad@uk.ac.ir

**Mehdi Mohayeji** 

Assistant Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail: abcdefg@uk.ac.ir

**Sepideh Ghotbzadeh-Kermani** 

Assistant Professor, Research and Technology Institute of Plant Production, Afzalipour Research Institute, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail: sghotbzadeh@uk.ac.ir

---

### **Abstract**

#### **Objective**

The aim of this study was assessment of the population structure and genetic diversity among 33 tomato genotypes including standard-fruit and cherry types, using ten ISSR markers through AMOVA, PCoA and STRUCTURE analysis in order to finding the best genetic materials for the future breeding program.

#### **Materials and methods**

DNA extraction was preformed from young leaves at first fruit set growth stage via CTAB method and genetic diversity of 33 genotypes in this study were assessed using 10 ISSR markers. PCR products of each ISSR marker were separated by agarose gel electrophoresis and presence/absence of the electrophoresis bands were scored. Afterward, different parameters including number and percentage of polymorphic bands, PIC and MI were calculated. The

population diversity and structure were analyzed using UPGMA clustering method, STRUCTURE, AMOVA and principal coordinates analysis (PCoA). PCoA data validation was performed using discriminant function analysis (DFA) method.

### Results

A total number of 10 ISSR anchored primers produced 130 bands of which 71 bands (more than 54.5%) were polymorphic. The highest polymorphic content was observed in markers (GA)<sub>8</sub>C, (AC)<sub>8</sub>G and (AG)<sub>8</sub>YC with 76.47, 75 and 68.42 percent respectively and the lowest polymorphic percentage was observed in marker (AGG)<sub>6</sub> with 23.07 percent. Based on the results of this study, markers with the highest polymorphic percentage were selected as suitable markers for studying the genetic diversity of tomato. STRUCTURE analysis K = 3 showed the proportion of shared genetic groups among three populations of tomato. Analysis of molecular variance study revealed that 91% of the total variance was within groups groups and 9% among group. Analyzing by PCoA reproduced a three-cluster pattern in which Maya (T12) and Lucid Gem American (T16) appeared as distant branches.

### Conclusions

ISSR markers particularly (GA)<sub>8</sub>C and (AC)<sub>8</sub>G effectively discriminated tomato genotypes. The identification of distinct accessions such as T12 and T16 provides valuable parents for wide crosses to broaden allelic diversity. The observed partial overlap between standard-fruit and cherry types is consistent with a shared breeding history and supports crossing across market classes to expand variation.

**Keywords:** cluster analysis, molecular markers, population structure, tomato

**Paper Type:** Research Paper.

**Citation:** Nazari, M., Nikbakht-Dehkordi, A., Mohammadi-Nejad, G., Mohayеji, M., & Ghotbzadeh-Kermani, S. (2026). Assessment of genetic diversity and population structure among some tomato (*Solanum lycopersicum*) genotypes using ISSR markers. *Agricultural Biotechnology Journal*, 18(1), 139-162.

---

*Agricultural Biotechnology Journal*, 18(1), 139-162. DOI: 10.22103/jab.2025.25205.1700

Received: October 08, 2025.

Received in revised form: December 26, 2025.

Accepted: December 27, 2025.

Published online: January 15, 2026.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian



Biotechnology Society.

© the authors

---

### Introduction

Plant breeding depends on protection of genetic resources and effective use of them in breeding programs. Tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the most important vegetables in

Iran that has high economic and widely used crops. Tomato is used in both processing and fresh markets, contributing to food security and rural income. Today, the use of domesticated and high-yielding varieties by farmers has led to a reduction in genetic diversity, resilience to climate changes and also increasing susceptibility to pests and diseases. Research showed that the genetic diversity of the tomato plant has decreased significantly over time due to domestication and the production of cultivated varieties. Therefore, characterizing extant diversity in local and international germplasm is therefore essential for future plant breeding programs. DNA-based molecular markers, particularly inter-simple sequence repeat (ISSR) markers, provide a practical, reproducible, and cost-effective approach to detect polymorphism across the genome. Here, we evaluate the population structure and genetic diversity of 33 tomato genotypes spanning standard-fruit and cherry types—using ISSR markers to investigate the genetic structure of tomato and to evaluate the genetic diversity of tomato for future planning in germplasm conservation and improvement.

### **Materials and methods**

**Plant materials.** Thirty-three genotypes including both standard-fruit (T) and cherry (CH) classes were collected from domestic and international suppliers. Genotypes were planted in standard pots and grown under greenhouse conditions; samples from young leaves were stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until genomic DNA extraction and PCR amplification. The CTAB protocol (with minor modifications) was used for DNA extraction, and DNA quality/quantity were checked by spectrophotometry and electrophoresis (agarose gel 1.5%). ISSR primers (Table 2) were amplified in 15  $\mu\text{L}$  reaction mixtures including 7.5  $\mu\text{L}$  of  $2\times$  Taq Master Mix, 2  $\mu\text{L}$  of genomic DNA ( $100\text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$ ), 2  $\mu\text{L}$  of primer (10 pmol), and 3.5  $\mu\text{L}$  of nuclease-free water. PCR reaction was carried out with an initial denaturation at  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  (5 minute), followed by 35 cycles of  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  (40 seconds), primer-specific annealing temperature (50 seconds), and  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  (50 seconds), with a final extension at  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  for (10 minute). Products were resolved on 1.8% agarose ( $0.5\times$  TBE), stained, and imaged under UV. Scoring and marker indices. Amplified bands from each primer were scored as present (1) or absent (0) for each cultivar. The Number of bands, percentage of polymorphic bands, polymorphic information content (PIC; 0.31–0.45), and marker index (MI) were recorded for each primer. Genetic analyses. Genetic similarity was computed using Jaccard's coefficient. UPGMA dendrograms were validated by Mantel/cophenetic correlation ( $\approx 0.79$ ) and interpreted at a 0.42 similarity cut-off. Ordination used principal coordinates analysis (PCoA). Population structure was inferred with STRUCTURE (admixture model; burn-in 10,000; MCMC 100,000;  $K=2-5$ );  $K$  was chosen by the  $\Delta K$  method. Individuals with cluster membership  $Q \geq 0.70$  were considered “pure,” otherwise “admixed.” AMOVA (GenAlEx) partitioned

variance between fruit-type groups (standard vs. cherry) and within groups. Where relevant, discriminant function analysis (DFA) was used to appraise separability.

### **Results**

The present study showed that ISSR markers, despite their dominant markers, are able to provide a clear picture of the pattern of genetic diversity in tomato. Different analyses (AMOVA, STRUCTURE, UPGMA, PCoA and DFA) in a complementary framework confirmed the existence of significant genetic diversity among genotypes, while also indicating a high overlap between standard-fruit and cherry types.

A total 130 bands were detected using ten ISSR primers, of which 71 bands were polymorphic (54.6%). Highest polymorphism was belonged to primers (GA)<sub>8</sub>C, (AC)<sub>8</sub>G, and (AG)<sub>8</sub>YC (76.47%, 75.00%, and 68.42%, respectively), while the lowest polymorphism was obtained from (AGG)<sub>6</sub> (23.07%). PIC ranged 0.31–0.45, indicating moderate-to-good discriminatory power. STRUCTURE analysis proved K = 3 genetic subpopulations. Using the Q ≥ 0.70 rule, a subset of genotypes was classified as pure while the remainder exhibited admixture—consistent with gene flow across market classes. Analysis of molecular variance (fruit-type grouping) showed that genetic variation within the group (91%) was substantially greater than variation among the group (9%) and demonstrating that diversity is concentrated within groups rather than between standard and cherry classes. UPGMA (Jaccard) yielded three main clusters at the 0.42 cut-off; notably, Maya (T12) and Lucid Gem American (T16) formed distant branches, marking them as genetically divergent. The first two PCoA axes explained ~20.82% of total variation and concurred with the dendrogram and STRUCTURE partitions. DFA, where applied, corroborated separation with 100% classification accuracy.

### **Conclusions**

ISSR markers-particularly (GA)<sub>8</sub>C and (AC)<sub>8</sub>G-proved efficient for distinguishing tomato genotypes. The identification of divergent accessions such as T12 and T16 provides robust candidates for wide crosses to wide allelic diversity. The partial overlap between standard-fruit and cherry types reflects a shared breeding history and supports cross-type parent combinations to expand variation. Integrating ISSR technic with other marker systems like SSRs or SNPs can help the breeders to improve accuracy of genotyping and find the best choices for further breeding program. Therefore, ISSR is valuable not only as a rapid tool for genetic diversity, but also as a preliminary platform for selecting and designing targeted breeding pathways using the studies. These findings enhance our understanding of the genetic relationships among tomato genotypes and provide valuable data for conservation planning and breeding programs.

### **Author Contributions**

Conceptualization: Nikbakht-Dehkordi A and Mohammadi-Nejad G, methodology: Nikbakht-Dehkordi A, software: Nikbakht-Dehkordi and Mohayеji M, validation: Nikbakht-Dehkordi A and Mohayеji, formal analysis: Ghotbzade Kermani S, investigation: Nazari M, resources: Mohammadi-Nejad G, data curation: Nazari M, writing—original draft preparation: Nikbakht-Dehkordi A; writing—review and editing, Ghotbzadeh-Kermani S and Mohayеji M, visualization: Nikbakht-Dehkordi A, supervision: Nikbakht-Dehkordi and Mohammadi-Nejad G, project administration: Nikbakht-Dehkordi A and Mohammadi-Nejad G, funding acquisition: Mohammadi-Nejad G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

### **Data Availability Statement**

Not applicable.

### **Acknowledgements**

The authors gratefully acknowledge the Research and Technology Institute of Plant Production (RTIPP), Afzalipour Research Institute, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.

### **Ethical Considerations**

Not applicable. The study involved cultivated plant material only and did not include human participants or vertebrate animals.

### **Funding**

This study was funded by the Research and Technology Institute of Plant Production (RTIPP), Afzalipour Research Institute, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.


### **Conflict of Interest**

The authors declare no conflict of interest.


## ارزیابی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت برخی از ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) با استفاده از نشانگرهای ISSR

مریم نظری رباطی


دانشجو دکتری، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: nazary.maryam.1378@gmail.com

 اعظم نیک‌بخت دهکردی


\*نویسنده مسئول: استادیار، پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، پژوهشگاه افضلی‌پور، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: anikbakht@uk.ac.ir

 قاسم محمدی نژاد

استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: mohammadinejad@uk.ac.ir

 مهدی مهبجی نصرآبادی

استادیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: mohayezji@uk.ac.ir

 سپیده قطب زاده کرمانی

استادیار، پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، پژوهشگاه افضلی‌پور، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: sghotbzadeh@uk.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۱۶ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۴/۱۰/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۰۶

### چکیده

**هدف:** این پژوهش با هدف بررسی ساختار جمعیت و تنوع ژنتیکی ۳۳ ژنوتیپ گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) شامل تیپ‌های معمولی و گیلاسی، با بهره‌گیری از نشانگرهای ISSR و تحلیل‌های AMOVA، PCoA و STRUCTURE انجام شد تا منابع ژنتیکی مناسب برای برنامه‌های به‌نژادی شناسایی شود.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش ۳۳ ژنوتیپ گوجه‌فرنگی در دو تیپ میوه معمولی و گیلاسی از ایران و سایر کشورها مورد بررسی قرار گرفتند. جهت بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، نمونه‌های برگ‌ی در مرحله ظهور اولین میوه‌ها برداشت و پس از استخراج DNA با استفاده از روش CTAB و با اندکی تغییرات با استفاده از ۱۰ نشانگر ISSR مورد آزمایش قرار گرفتند. داده‌های حاصل پس از جداسازی با الکتروفورز، بر اساس شاخص‌های نشانگر (تعداد و درصد باندهای چندشکل، PIC و MI)،

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)، خوشه‌بندی UPGMA (ضریب جاگرد)، تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) و تحلیل ساختار جمعیت (STRUCTURE) مورد بررسی قرار گرفتند.

**نتایج:** در این مطالعه از میان ۱۳۰ باند ایجاد شده ۷۱ عدد باند (بیش از ۵۴/۵ درصد) چند شکل بودند. بیشترین محتوای چند شکلی در نشانگرهای (GA)8C، (AC)8G و (AG)8YC به ترتیب با ۷۶/۴۷، ۷۵ و ۶۸/۴۲ درصد و کمترین درصد چندشکلی در نشانگر (AGG)6 با مقدار ۲۳/۰۷ درصد مشاهده گردید. بر اساس نتایج این پژوهش نشانگرهای دارای بیشترین درصد چند شکلی به عنوان نشانگرهای مناسب در بررسی تنوع ژنتیکی گوجه‌فرنگی انتخاب شدند.

تحلیل ساختار جمعیت (STRUCTURE) ژنوتیپ‌ها را به سه زیرجمعیت متمایز تفکیک کرد. AMOVA با گروه‌بندی به دو تیپ میوه (معمولی و گیلاسی) نشان داد ۹۱٪ از واریانس کل درون گروهی و ۹٪ بین گروهی است. PCoA بر پایه فاصله‌ی جاگرد نیز پراکنش ژنوتیپ‌ها را در سه خوشه بازنمایی کرد. خوشه‌بندی UPGMA با خط بُرش ۰/۴۲ سه گروه مشخص ارائه داد که در آن Maya (T12) و Lucid Gem American (T16) به صورت شاخه‌های دورافتاده، بیشترین فاصله‌ی ژنتیکی را نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها نشان دادند. هم‌سویی STRUCTURE و PCoA سه‌گانگی جمعیت را تأیید کرد و DFA نیز جدایی گروه‌ها را با دقت ۱۰۰٪ تأیید نمود.

**نتیجه‌گیری:** این پژوهش نشان داد که نشانگرهای ISSR، به‌ویژه (GA)8C و (AC)8G ابزاری کارآمد برای تفکیک ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی هستند. سهم بالای تنوع درون جمعیتی (۹۱٪) در برابر بین جمعیتی، همراه با هم‌پوشانی نسبی تیپ‌های معمولی و گیلاسی، بیانگر تاریخچه اصلاحی مشترک اما غنی از نظر منابع آلی است. در عین حال، شناسایی ژنوتیپ‌های متمایز مانند Maya (T12) و Lucid Gem American (T16) فرصت ارزشمندی برای استفاده در تلاقی‌های دور و گسترش تنوع ژنتیکی فراهم می‌کند.

**کلمات کلیدی:** تجزیه خوشه‌ای، ساختار جمعیت، گوجه‌فرنگی، نشانگرهای مولکولی

**نوع مقاله:** پژوهشی.

**استناد:** نظری ریاطی مریم، نیک‌بخت دهکردی اعظم، محمدی‌نژاد قاسم، مهیجی نصرآبادی مهدی، قطب زاده کرمانی سپیده (۱۴۰۵) ارزیابی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت برخی از ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) با استفاده از نشانگرهای ISSR. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۸(۱)، ۱۳۹-۱۶۲.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.



© the authors

## مقدمه

گوجه‌فرنگی با نام علمی (*Solanum Lycopersicum*) گیاهی زراعی-باغی از خانواده سولاناسه می‌باشد که خودگشن و دیپلوئید است و دارای ۲۴ کروموزوم ( $2n = 2X = 24$ ) می‌باشد (Tom & Diwivedi, 2020). اندازه ژنوم این گیاه حدود ۹۵۰ Mb برآورد شده است که بیش از ۷۵ درصد از آن هتروکروماتین و فاقد ژن می‌باشد (Díez & Nuez, 2008).

میوه‌ی گوجه‌فرنگی از نظر تغذیه‌ای غنی است و به علت داشتن انواع ویتامین‌ها (اسکوربیک اسید یا ویتامین C، ویتامین B1، A، B2، و نیاسین)، لیکوپن، کاروتن، ترکیبات فنلی، اسیدهای مفید، قند و املاح معدنی نقش مهمی را در سلامت انسان دارد (Kordkatooli et al., 2024). از منظر اقتصادی محصول گوجه‌فرنگی دومین محصول پر ارزش در کشاورزی بعد از سیب‌زمینی به لحاظ سرانه مصرف می‌باشد که به دو صورت تازه و فرآوری شده استفاده می‌شود و میزان تولید آن در سراسر جهان رو به افزایش است. این محصول در مقیاس جهانی کشت وسیعی دارد و سطح زیرکشت آن حدود ۷/۳ میلیون هکتار و تولید سالانه نزدیک به ۱۸۰۷۶۶۳۳۹ تن برآورد شده است (FAO, 2021). امروزه حدود ۷۵۰۰ رقم کشت‌شده‌ی گوجه‌فرنگی در سراسر جهان وجود دارد که از نظر اندازه، شکل، رنگ و طعم با یکدیگر تفاوت دارند شناخت تنوع ژنتیکی موجود در میان این ارقام، در چنین شرایطی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. تحقیقات نشان می‌دهد تنوع ژنتیکی گیاه گوجه‌فرنگی در گذر زمان اهلی شدن و تولید رقم‌های زراعی و در نتیجه گزینش شدید کاهش محسوسی داشته است و امروزه کمتر از ۱۰ درصد از تنوع ژنتیکی را در گونه‌های زراعی گوجه‌فرنگی می‌توان مشاهده نمود. لذا شناخت تنوع ژنتیکی یک ژرم‌پلاسما برای فعالیت‌های اصلاح‌نژادی گیاهان که به دنبال توسعه واریته‌هایی با کیفیت بالا، عملکرد بالا، مقاوم به عوامل زیستی و غیرزیستی و سایر ویژگی‌های اقتصادی مهم هستند، بسیار اهمیت دارد (Pravitha et al., 2024). اولین قدم برای شروع هر برنامه به‌نژادی، آگاهی از میزان تنوع گیاه مورد بررسی می‌باشد. روش‌های گوناگونی برای ارزیابی و توصیف ژنوتیپ‌های مختلف گوجه‌فرنگی به کار رفته‌اند، زیرا بیشتر ژنوتیپ‌های محلی این گیاه بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی و عملکردی معرفی شده‌اند. طبقه‌بندی گونه‌های گیاهی بر پایه‌ی ویژگی‌های ریخت‌شناسی و عملکردی از متداول‌ترین و رایج‌ترین روش‌ها به شمار می‌رود. با این حال، بسیاری از این صفات به شدت از شرایط محیطی تأثیر می‌پذیرند و ممکن است نتایج متفاوت و غیرقابل اتکا برای تمایز ژنوتیپ‌ها به‌دست دهند. علاوه بر این، چنین روش‌هایی نیازمند صرف زمان و نیروی انسانی زیادی هستند (Nazari et al., 2024). از این‌رو، امروزه ضرورت دارد این رویکردها با فناوری‌های نوین زیست‌فناوری، به‌ویژه نشانگرهای مولکولی که ابزارهایی دقیق، سریع و مستقل از محیط هستند، پشتیبانی شوند. این نشانگرها، اطلاعات دقیقی در مورد ساختار ژنتیکی و تنوع درون و بین جمعیت‌های گیاهی فراهم می‌کنند و بر پایه‌ی مطالعه‌ی توالی‌های DNA بنا شده‌اند که به دلیل تعداد بسیار زیاد، پایداری و عدم تأثیرپذیری از شرایط محیطی، برای تعیین تنوع ژنتیکی و برآورد شباهت ژنتیکی میان ژنوتیپ‌ها به کار می‌روند (Eleuch et al., 2008). و امکان گزینش دقیق‌تر و کارآمدتر ارقام جدید را فراهم می‌سازند و می‌توان در برنامه‌های اصلاحی گزینش به کمک نشانگر استفاده کرد (Varges et al., 2020a). در میان این روش‌ها، نشانگر بین‌ریزماهوره‌ای (Sequence Repeat – ISSR Inter Simple) یکی از پرکاربردترین تکنیک‌ها برای بررسی تغییرپذیری ژنتیکی در گیاهان است. این نشانگر توانایی بالایی در آشکارسازی سطوح پایین تنوع ژنتیکی دارد و در مطالعات ژنتیکی بسیاری از گونه‌های گیاهی مؤثر واقع شده است (Li et al., 2008). این نشانگر که از توالی‌های تکراری ریزماهوره به عنوان آغازگر استفاده می‌کند و بر تکثیر قطعات بین دو ناحیه ریزماهوره مشابیه تکیه دارد و علی‌رغم اینکه یک نشانگر غالب است، به‌طور گسترده‌ای برای مطالعات تنوع ژنتیکی، فیلوژنی، ژنومیک و زیست‌شناسی تکاملی استفاده شده است (Zarabian et al., 2025; Hosseini et al., 2023a; Ahang et al., 2024). طول بلند توالی‌های نشانگر ISSR،



تکرارپذیری بالایی را ارائه می‌دهد که حتی در نشانگرهای ریزماهواره (SSR, Simple Sequence Repeat) نیز مشاهده می‌شود (Mohammadabadi et al., 2017). این ویژگی‌ها باعث شده تا نشانگر ISSR به دلیل سرعت و سادگی، به یکی از ابزارهای محبوب در تحقیقات مولکولی تبدیل شود (Mohammadabadi et al., 2021; Haghpanah et al., 2016). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که نشانگرهای مولکولی ISSR و SSR ابزارهای بسیار مؤثری برای بررسی تنوع ژنتیکی در گوجه‌فرنگی هستند. به عنوان مثال، تنوع ژنتیکی ۳۰ توده گوجه‌فرنگی با استفاده از این نشانگرها بررسی شده و مشخص شده است که تنوع ژنتیکی درون و بین گونه‌ها به طور قابل توجهی بالا است و هر دو تکنیک کارایی مناسبی در ارزیابی تنوع ژنتیکی گوجه‌فرنگی دارند (Hosseini et al., 2023b). در پژوهشی دیگر تنوع ژنتیکی ۹۹ رقم گوجه‌فرنگی ایرانی با استفاده از ۲۰ آغازگر ISSR بررسی شد که ۱۷ آغازگر چندشکلی بودند و میانگین چندشکلی ۹۷ درصد گزارش گردید. تجزیه خوشه‌ای و مؤلفه‌های اصلی، ارقام را در پنج گروه متمایز طبقه‌بندی کردند و نتایج نشان داد نشانگرهای ISSR ابزار کارآمدی برای شناسایی و تمایز ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی هستند و می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی و مدیریت ژرمپلاسم این گیاه به کار روند (Heydari, Tootshami & Salari, 2024). در مطالعه‌ی دیگر که بر روی ۹۳ توده بومی از نواحی شرق آناتولی ترکیه و شمال غرب ایران به همراه سه رقم تجاری انجام شد، تمام آغازگرها چندشکلی ۱۰۰ درصدی را نشان دادند و میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار بین ۰/۱۵۳ تا ۰/۳۰ متغیر بود. بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای، توده‌ها در ۹ گروه طبقه‌بندی شدند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که نشانگر ISSR می‌تواند ابزار مؤثری برای بررسی ساختار ژنتیکی و روابط خویشاوندی میان توده‌های بومی گوجه‌فرنگی از مناطق جغرافیایی مختلف باشد (Hanare et al., 2016a). لذا با توجه به اهمیت گوجه‌فرنگی در سبد غذایی بشر و از دست رفتن تنوع ژنتیکی گونه‌ها زراعی طی اهلی شدن و همچنین قابلیت نشانگر ISSR به عنوان یک ابزار قابل اطمینان برای تعیین تنوع ژنتیکی در سایر گیاهان و توانایی تمایز بالا حتی بین واریته‌های نزدیک (Sarwat, 2012). این مطالعه به منظور بررسی ساختار ژنتیکی گوجه‌فرنگی و با هدف ارزیابی تنوع ژنتیکی گوجه‌فرنگی برای برنامه‌ریزی‌های آتی در زمینه‌ی حفظ و اصلاح ژرمپلاسم طراحی و اجرا گردید.

## مواد و روش‌ها

مواد گیاهی در این پژوهش از بذر ۳۳ ژنوتیپ گوجه‌فرنگی شامل تیپ‌های معمولی (T) و گیلاسی (CH) استفاده شد (جدول ۱). ژنوتیپ‌ها از منابع بذر داخلی و بین‌المللی تهیه و در گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، پژوهشگاه افضلی‌پور، دانشگاه شهید باهنر کرمان کشت گردیدند. نمای ظاهری برخی از ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در شکل ۱ نشان داده شده است. این مجموعه شامل ژنوتیپ‌های متنوع از نظر اندازه، رنگ و فرم میوه بوده و ترکیبی از ارقام تجاری، اصلاح‌شده و بومی را در برمی‌گیرد که تنوع بالایی از صفات مورفولوژیکی و ژنتیکی را فراهم می‌سازد. از هر ژنوتیپ یک نشا در گلدان‌هایی با طول ۳۰ و قطر ۲۰ سانتیمتر حاوی خاک نرم و کود حیوانی سرنده شده و همچنین ماسه یا شن شسته شده به ترتیب به نسبت ۴: ۱: ۱/۵ کشت شدند و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار (برای هر ژنوتیپ سه گلدان) در گلخانه قرار گرفتند. در طی آزمایش دمای گلخانه در طول روز برابر ۲۵ درجه و در شب ۱۶ درجه سانتی‌گراد حفظ شد. نمونه‌گیری از برگ‌های سبز و جوان گیاه گوجه‌فرنگی صورت گرفت. سپس نمونه‌ها تا زمان استخراج DNA در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جدول ۱. ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. List of Tomato Genotypes Used in this Study

شماره Number	نام ژنوتیپ Genotype Name	نوع میوه Fruit Type	تامین کننده Supplier	منشا Origin	نوع ژنوتیپ Genotype Type
T1	قلبی نارنجی آمریکایی Orange Strawberry American	معمولی Tomato	فردین کشت Fardin Kesht	آمریکا USA	رقم Cultivar
T2	موزی نارنجی آمریکایی Orange Banana American	معمولی Tomato	فردین کشت Fardin Kesht	آمریکا USA	رقم Cultivar
T3	آریا Arya	معمولی Tomato	فردین کشت Fardin Kesht	ترکیه- ایران Turkey- Iran	رقم محلی Local- Cultivar
T4	ارغوانی آمریکایی Cherokee purple American	معمولی Tomato	فردین کشت Fardin Kesht	آمریکا USA	رقم Cultivar
T5	موزی زرد آمریکایی Yellow Banana American	معمولی Tomato	گل‌س گاردن Glass Garden	آمریکا USA	رقم Cultivar
T6	روسی Paul Robeson	معمولی Tomato	فردین کشت Fardin Kesht	روسیه Russia	رقم Cultivar
T7	کهکشان تیره آمریکایی Dark Galaxy American	معمولی Tomato	فردین کشت Fardin Kesht	آمریکا USA	رقم Cultivar
T8	قرمز دندانه‌دار Gezahnte	معمولی Tomato	فردین کشت Fardin Kesht	آلمان Germany	رقم Cultivar
T9	آناناسی Pineapple	معمولی Tomato	گل‌س گاردن Glass Garden	فرانسه- ایتالیا France- Italy	رقم Cultivar
T10	یاس بنفش آمریکایی Violet jasper American	معمولی Tomato	کشاورزی آنلاین Keshavarzi Online	آمریکا USA	رقم Cultivar
T11	تخم مرغی صورتی تایلندی Thai Pink Egg	معمولی Tomato	فردین کشت Fardin Kesht	تایلند Thailand	رقم Cultivar
T12	مایا Maya	معمولی Tomato	کشاورزی آنلاین Keshavarzi Online	شیلی Chile	رقم Cultivar
T13	راک Rock	معمولی Tomato	کشاورزی آنلاین Keshavarzi Online	هلند Netherland	رقم Cultivar
T14	گرد محلی Round	معمولی Tomato	کشاورزی آنلاین Keshavarzi Online	ایران Iran- Kerman	رقم Cultivar
T15	موزی Banana	معمولی Tomato	گل‌س گاردن Glass Garden	آمریکا USA	رقم Cultivar
T16	الماس روشن آمریکایی Lucid Gem American	معمولی Tomato	فردین کشت Fardin Kesht	آمریکا USA	رقم Cultivar
T17	روسی Black Krim	معمولی Tomato	فردین کشت Fardin Kesht	روسیه Russia	رقم Cultivar

## نظری و همکاران، ۱۴۰۵

T18	سبز اوکراینی Vernissage Green	Tomato معمولی	فردین کشت Fardin Kesht	اوکراین Ukrain	رقم Cultivar
CH1	گیلاسی قرمز چادویک Chadwick Cherry	گیلاسی Cherry	فردین کشت Fardin Kesht	آمریکا USA	رقم Cultivar
T19	سوپر استرین آمریکایی Super strain b American Tomato	Tomato معمولی	فردین کشت Fardin Kesht	آمریکا USA	رقم Cultivar
T20	سوپر کریستال Super crystal	Tomato معمولی	فردین کشت Fardin Kesht	آمریکا USA	رقم Cultivar
T21	سوپر کوین Super-queen	Tomato معمولی	گل‌س گاردن Glass Garden	آمریکا USA	رقم Cultivar
T22	موناکو Monaco	Tomato معمولی	کشاورزی آنلاین Keshavarzi Online	تایلند Thailand	رقم Cultivar
T23	تخم مرغی خارجی Plum Consumption	Tomato معمولی	کشاورزی آنلاین Keshavarzi Online	ایتالیا Italy	هیبرید Hybrid
T24	پاندروسا Ponderosa Sel	Tomato معمولی	بانک بذر جنوب South Seed Bank	ایتالیا Italy	هیبرید Hybrid
T25	توندینو Tondino Giallo	Tomato معمولی	بانک بذر جنوب South Seed Bank	ایتالیا Italy	هیبرید Hybrid
T26	کوردی بو Cour Di Bue	Tomato معمولی	بذرام Baz ram	ایتالیا Italy	هیبرید Hybrid
CH2	مارزانو S Marzano lampadina2	گیلاسی Cherry	بانک بذر جنوب South Seed Bank	ایتالیا Italy	هیبرید Hybrid
CH3	پلام.سل.فیا‌سچتو Plum Sel. Fiaschetto	گیلاسی Cherry	بانک بذر جنوب South Seed Bank	ایتالیا Italy	هیبرید Hybrid
CH4	روما Roma VF	گیلاسی Cherry	بانک بذر جنوب South Seed Bank	آمریکا USA	هیبرید Hybrid
CH5	مارزانو S Marzano Nano	گیلاسی Cherry	بانک بذر جنوب South Seed Bank	ایتالیا Italy	هیبرید Hybrid
CH6	ونتورا Ventura o Chico3	گیلاسی Cherry	بانک بذر جنوب South Seed Bank	ایتالیا-آمریکا USA-Italy	هیبرید Hybrid
CH7	ناپولی Napoli VF	گیلاسی Cherry	بانک بذر جنوب South Seed Bank	ایتالیا Italy	هیبرید Hybrid

**استخراج DNA:** به منظور استخراج DNA، از روش CTAB (Doyle & Doyle 1987) استفاده شد. مقدار ۵/۰ گرم پودر برگ گیاه به همراه ۷۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (NaCl 2.5 M, Tris base 1M:pH 8, EDTA 0.5 M: pH 8 CTAB 3% (W/V), PVP 4% (W/V), β-Mercaptoethanol 2% (v/v)) در دمای ۶۵ درجه به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس ۴۵۰ میکرولیتر محلول کلروفرم ایزوامیل الکل (۱:۲۴) به آن اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ با ۱۳۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. سپس فاز رویی محلول برداشته، مقدار ۵۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر محلول ۱۰ درصد CTAB (بسته به رنگ محلول) به همراه ۴۵۰ میکرولیتر محلول کلروفرم ایزوامیل الکل به آن اضافه و مانند قبل سانتریفیوژ گردید. بعد از اتمام سانتریفیوژ، فاز رویی برداشته و بار دیگر مانند قبل با کلروفرم ایزوامیل الکل شستشو گردید. برای تشکیل پلیت DNA از ۴۵۰

میکرولیترایزوپروپانول سرد استفاده شد. کمیت و کیفیت سنجی DNA حاصله به دو روش اسپکتوفتومتری و ژل آگارز ۱ درصد انجام گرفت.



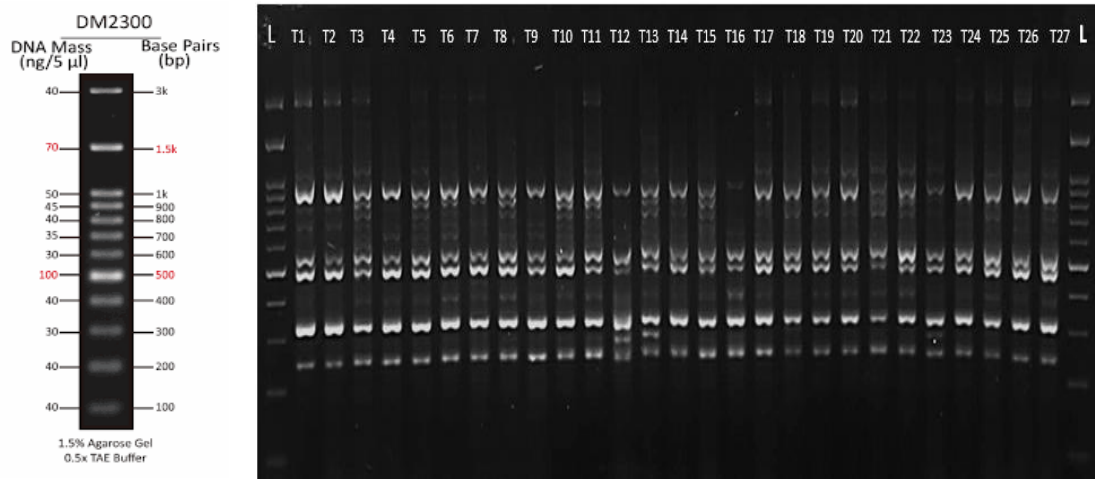
شکل ۱. نمای ظاهری ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی مورد مطالعه (T= تیپ میوه معمولی، CH = تیپ میوه گیلاسی)  
**Figure 1. Fruit morphology of tomato genotypes. (T= standard fruit type, CH= cherry fruit type)**

**واکنش زنجیره‌ای پلیمرز:** جهت بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تعداد ۱۰ نشانگر ISSR شکل انتخاب شد. انتخاب آغازگرها بر اساس مطالعات قبلی (Heydari-Tootshami & Salari, 2023) روی گوجه‌فرنگی و همچنین آزمایش مقدماتی روی مجموعه‌ای از آغازگرها انجام شد و آغازگرهایی که باند واضح و چند شکلی مناسب داشتند انتخاب شدند. نام، توالی و دمای اتصال آغازگرها در (جدول ۲) آورده شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۱۵ میکرولیترا انجام شد که شامل: ۷/۵ میکرولیترا Taq 2x Master Mix (شرکت Ampliqon)، ۲ میکرولیترا DNA ژنومی با غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیترا، ۲ میکرولیترا آغازگر با غلظت ۱۰ پیکومول و ۳/۵ میکرولیترا آب مقطر استریل بود. تکثیر در دستگاه ترموسایکلر Bio RAD (PCR System, USA) طی چرخه‌های PCR بدین شرح که یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای بین ۴۷-۵۳ درجه سانتی‌گراد (بسته به نوع آغازگر) به مدت ۵۰ ثانیه، مرحله بسط به مدت ۵۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک چرخه بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، انجام شد. جداسازی قطعات تکثیر شده با استفاده از ژل آگارز ۱/۸ درصد به همراه بافر TBE 0/5X انجام شد. رنگ‌آمیزی ژل توسط DNA Green Viewer و عکس‌برداری با استفاده از دستگاه UV Gel document انجام شد (شکل ۲).

جدول ۲. نام، توالی و دمای اتصال آغازگرهای ISSR

Table 2. Nam, Sequence and annealing temperature of ISSR primers

ردیف row	نام آغازگر Primer name	توالی (۵' به ۳') Sequence (5' to 3')	دمای اتصال (C°) Annealing Temperature (C°)
1	ISSR-1	AGAGAGAGAGAGAGAYC	52°
2	ISSR-2	ACACACACACACACC	50°
3	ISSR-3	GAGAGAGAGAGAGAC	54 °
4	ISSR-4	GAGAGAGAGAGAGAYG	53°
5	ISSR-5	TCTCTCTCTCTCTCC	54°
6	ISSR-6	HVHTCCTCCTCCTCCTCC	52°
7	ISSR-7	GAGAGAGAGAGAGAGA	49°
8	ISSR-8	GACAGACAGACAGACA	48°
9	ISSR-9	ACACACACACACACG	50°
10	ISSR-10	AGGAGGAGGAGGAGGAGG	58°



شکل ۲. الگوی بانندی حاصل از آغازگر ISSR-3 در ارقام گوجه‌فرنگی (چاهک ۱ تا ۲۷) روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، L: نشانگر تعیین اندازه DNA

Figure 2. The band pattern using ISSR-3 primer for tomato's cultivars (lane 1 to 27) on 1.5 % agarose gel, L: DNA size marker

تجزیه آماری (تحلیل داده‌ها): باندهای بدست آمده از آغازگرهای ISSR به صورت صفر (عدم حضور باند) و یک (حضور باند) کد گذاری شدند. برای محاسبه محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) از فرمول  $PIC = \sum 2f(f-1)$  استفاده شد که در این رابطه موارد به صورت زیر تعریف شدند (Powell et al., 1996).

f: فراوانی نسبی باندهای مشاهده شده و f-1: فراوانی نسبی باندهای غایب می‌باشد. تعداد کل باند، درصد چندشکلی و تعداد باندهای چندشکل و شاخص نشانگر (MI) که نشان دهنده قدرت تفکیک یک نشانگر می‌باشد و همچنین از حاصل ضرب درصد چندشکلی در محتوای اطلاعات چندشکلی محاسبه گردید. ماتریس تشابه جمعیت‌ها بر اساس سه ضریب تشابه جاکارد و دایس محاسبه شد. به منظور انتخاب مناسب‌ترین روش خوشه‌بندی، شاخص کوفتیک (Coph index) بین ماتریس تشابه اولیه و

دندروگرام‌های حاصل از روش‌های مختلف محاسبه شد. نتایج نشان داد که ترکیب ضریب جاکارد با روش UPGMA دارای بالاترین مقدار (۰/۷۹۶) Coph index بود و بنابراین به‌عنوان روش نهایی خوشه‌بندی ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی در این پژوهش انتخاب گردید. برای یافتن بهترین الگوریتم، آزمون مانتل و ماتریس تشابه از برنامه NTSys نسخه ۲/۰۲ استفاده شد. تجزیه عاملی و تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx 6.4 انجام شد (Peakall & Smouse, 2006). ساختار جمعیت با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE نسخه ۲.۳.۴ رسم شد و این تحلیل با ۱۰۰۰۰۰ تکرار برای فاز پایدارسازی اولیه (burn-in) و سپس ۱۰۰۰۰۰۰ تکرار زنجیره مارکوف مونت کارلو (MCMC) تحت مدل آمیزش (admixture model) انجام شد. تحلیل برای محدوده کلاسترهای ژنتیکی (K) از K=2 تا K=5 با پنج تکرار برای هر K اجرا گردید.

### نتایج و بحث

**قطعات تکثیری و شاخص‌های نشانگر:** بر اساس نتایج مطالعه حاضر، تمامی آغازگرهای مورد استفاده قادر به نمایش چندشکلی بین ژنوتیپ‌ها بودند. بررسی ۳۳ ژنوتیپ گوجه‌فرنگی نشان داد که از تعداد کل باندهای حاصل از ۱۰ آغازگر ISSR، تعداد ۱۳۰ باند تولید گردید که ۷۱ باند (۵۴/۶٪) آن‌ها چندشکل بودند. بیشترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگرهای ISSR-3 (۷۶/۴۷٪)، ISSR-9 (۷۵٪) و ISSR-1 (۶۸/۴۲٪) و کمترین درصد چندشکلی مربوط به ISSR-10 (۲۳٪) و ISSR-4 (۲۵٪) بود (جدول ۳). آغازگرهای ISSR به تکرارهای ساده دی‌نوکلئوتیدی مانند (GA)<sub>n</sub> و (AC)<sub>n</sub> متکی هستند. این توالی‌ها در ژنوم گوجه‌فرنگی فراوان‌اند و به دلیل پراکندگی وسیع در سراسر ژنوم، باندهای متنوع‌تری ایجاد کرده و درصد چندشکلی و قدرت تفکیک بالاتری فراهم می‌کنند. مطالعات پیشین نیز نشان داده‌اند که همین موتیف‌ها در تمایز ژنوتیپ‌ها و بازسازی ساختار جمعیت بسیار کارآمد هستند (Tikunov et al., 2003؛ Kochieva et al., 2002؛ Zietkiewicz et al., 1994). مقادیر محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) در این پژوهش بین ۰/۳۱ تا ۰/۴۵ متغیر بود که طبق معیارهای پذیرفته‌شده، بیانگر قدرت تفکیک متوسط تا مطلوب آغازگرها است. نکته‌ی قابل توجه آن است که برخی آغازگرها مانند ISSR-10 با وجود درصد چندشکلی پایین‌تر، به دلیل توزیع متوازن‌تر باندها دارای مقدار PIC بالاتری بودند. این امر نشان می‌دهد چنین آغازگرهایی هرچند تعداد محدودی باند چندشکل آشکار می‌کنند، اما در تمایز ژنتیکی ژنوتیپ‌ها نقش مؤثری دارند و می‌توانند دقت نتایج مربوط به تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت را افزایش دهند. مطالعات مختلف روی گوجه‌فرنگی دامنه‌های متفاوتی از چندشکلی و PIC را گزارش کرده‌اند. برای مثال، (Hernández-Ibáñez et al., 2017) در بررسی ۲۹ نشانگر ISSR چندشکلی ۷۷/۹٪ را گزارش کردند. در مطالعه حاضر نیز درصد چندشکلی به طور میانگین ۵۴/۶٪ به دست آمد که گرچه پایین‌تر از مطالعه مذکور است، اما همچنان نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی قابل توجه در ژنوتیپ‌های مورد بررسی است. همچنین (Gonias et al., 2019) در ارزیابی ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی با SSR، سطح بالایی از تنوع ژنتیکی با میانگین PIC برابر با ۰/۷۴ یافتند. در مقابل، (Aguilera et al., 2011a) با استفاده از ۱۰ نشانگر ISSR در ۹۶ رقم گوجه‌فرنگی تنها ۳۴ تا ۳۷ درصد چندشکلی مشاهده کردند که ناشی از پایه‌ی ژنتیکی محدود ارقام تجاری بود. به همین ترتیب، (Henareh et al., 2016b) در ۹۳ لندریس از ترکیه و ایران با ۱۴ آغازگر ISSR، چندشکلی بالایی ۹۰٪ و تفکیک روشن بین توده‌ها را نشان دادند. افزون بر این، (Vargas et al., 2020b) در بررسی ۵۵ ژنوتیپ گوجه‌فرنگی

گزارش کردند که ISSR ابزار مناسبی برای آشکارسازی ساختار جمعیت است. در ایران نیز (Heydari-Tootshami & Salari, 2024) بیان کردند که ISSR با ایجاد الگوهای باندهای متنوع و مقادیر مطلوب شاخص‌های PIC و MI می‌تواند برای تفکیک ارقام تجاری گوجه‌فرنگی بسیار مفید باشد. بر این اساس، میانگین چندشکلی ۵۴/۶٪ در پژوهش حاضر در جایگاهی میانی نسبت به نتایج مطالعات پیشین قرار می‌گیرد، یعنی بالاتر از گزارش‌های با تنوع محدود مانند (Aguilera et al., 2011b) و پایین‌تر از مطالعات با تنوع بسیار بالا مانند (Henareh et al., 2016c). این جایگاه نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی ارزشمند در ژنوتیپ‌های مورد بررسی است، هرچند میزان آن کمتر از ذخایر لندریس و خویشاوندان وحشی است. از دیدگاه اصلاح نباتات، چنین سطحی از تنوع فرصت مناسبی برای انتخاب والدین و طراحی تلاقی‌های هدفمند فراهم می‌کند. به‌ویژه آغازگرهایی مانند ISSR-3 و ISSR-9 با درصد چندشکلی بالا و آغازگرهایی مانند ISSR-10 با مقدار PIC نسبتاً زیاد می‌توانند مکمل یکدیگر بوده و تصویری دقیق‌تر از ساختار ژنتیکی ژرمپلاسم گوجه‌فرنگی ارائه دهند.

### جدول ۳. آغازگرهای ISSR و شاخص‌های بدست آمده

Table 3. ISSR markers and obtained indicators

آغازگر Primer	توالی Sequence	تعداد کل نوار No. of total bands	تعداد نوار چند شکل No. of Polymorphic bands		درصد چند شکلی Polymorphism % %	شاخص نشانه‌گری Marker Index (MI)	محتوای اطلاعات چند شکلی Polymorphic Information Content (PIC)
ISSR-1	(AG)8 YC	19	13		68.42	0.27	0.40
ISSR-2	(AC)8 C	9	5		55.55	0.20	0.37
ISSR-3	(GA)8 C	17	13		76.47	0.26	0.34
ISSR-4	(GA)8 YG	12	3		25	0.09	0.38
ISSR-5	(TC)8 C	9	5		55.55	0.24	0.43
ISSR-6	HVH (TCC)5	11	4		36.36	0.12	0.35
ISSR-7	(GA)8	13	8		61.53	0.22	0.36
ISSR-8	(GACA)4	15	8		53.33	0.16	0.31
ISSR-9	(AC)8 G	12	9		75	0.27	0.36
ISSR-10	(AGG)6	13	3		23.07	0.15	0.45

### شاخص‌های تنوع ژنتیکی: برای بررسی سهم تنوع ژنتیکی بین و درون گروه‌ها، تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)

بر اساس دو تیپ میوه شامل گوجه‌فرنگی‌های معمولی (Tm) و گیلاسی (Ch) انجام شد (جدول ۴). نتایج نشان داد که ۹۱ درصد از واریانس ژنتیکی کل به درون گروه‌ها و تنها ۹ درصد به بین گروه‌ها اختصاص دارد. مقدار  $\Phi_{PT} = 0.092$  ( $P=0.01$ ) که آنالوگ Fst برای داده‌های غالب است، نشان‌دهنده سطح پایین تا متوسط اما معنی‌دار از تمایز ژنتیکی میان دو تیپ میوه می‌باشد. این یافته بیانگر آن است که بخش عمده‌ی تغییرات ژنتیکی در سطح افراد هر گروه رخ می‌دهد، با این حال تفاوت موجود بین Tm

و Ch واقعی بوده و می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار گیرد (Peakall & Smouse, 2012). بررسی‌های ژنوتایپی در گوجه‌فرنگی‌های کشت‌شده نشان داده‌اند که تیپ‌های میوه یا کلاس‌های بازار نظیر cherry در برابر fresh از یکدیگر قابل تفکیک‌اند، اما در بیشتر موارد سهم واریانس درون‌گروهی بیشتر از بین‌گروهی است و میزان آمیختگی ژنتیکی، به‌ویژه در تیپ گیلاسی، قابل توجه گزارش شده است (Corrado et al., 2013a). مطالعات مبتنی بر ISSR نیز الگوی مشابهی را تأیید کرده‌اند، به‌گونه‌ای که بخش عمده‌ی تنوع در سطح درون‌گروهی باقی مانده و ساختار بین‌گروهی در سطح ضعیف تا متوسط قرار داشته است (Vargas et al., 2020c; Henareh et al., 2016d). بر این اساس، الگوی به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر (۹۱٪ درون‌گروهی و ۹٪ بین‌گروهی) در محدوده‌ی انتظار برای ژنوتیپ‌های کشت‌شده قرار می‌گیرد. از دیدگاه اصلاحی، این نتایج نشان می‌دهد که انتخاب والدین از دو تیپ متفاوت (Tm × Ch) می‌تواند به افزایش تمایز ژنتیکی در نسل‌های بعدی کمک کند. افزون بر این، با توجه به سهم بالای تنوع درون‌گروهی، توصیه می‌شود برای آشکارسازی دقیق‌تر ساختار ژنتیکی از نشانگرهای با قدرت تفکیک بالاتر (SSR یا SNP) یا تعداد بیشتری آغازگر استفاده شود.

جدول ۴. نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی بر اساس نشانگر ISSR و گروه‌بندی به دو تیپ میوه‌ی معمولی (Tm) و گیلاسی (Ch)

Table 4. Analysis of molecular variance (AMOVA) of tomato genotypes based on ISSR markers and grouping into two fruit types, conventional (Tm) and cherry (Ch)

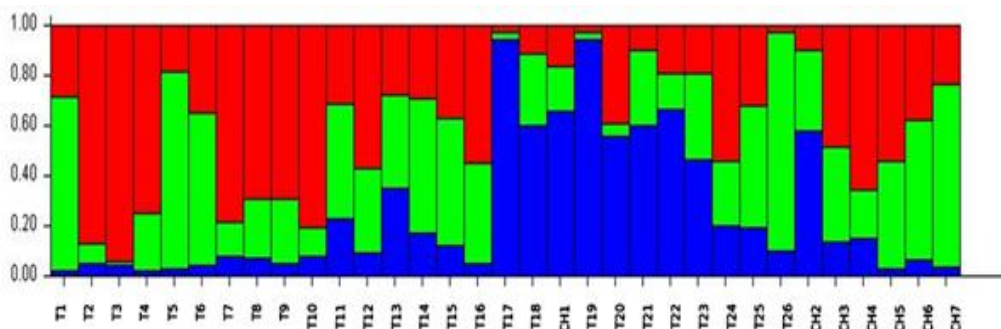
منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	مجموع مربعات sum of squares	میانگین مربعات Mean of squares	اجزای واریانس Variance Component	درصد واریانس کل Percentage of total Variance
بین جمعیت‌ها Between populations	1	28.09	28.09	1.35**	9**
داخل جمعیت‌ها Within populations	31	410.4	13.24	13.24	91
کل Total	32	438.5		14.59	100

PhiPT = 0.092\*\* (P = 0.010)

گروه‌بندی ژنوتیپ‌های ارزیابی شده و تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت: بر اساس تحلیل STRUCTURE، ۳۳ ژنوتیپ گوجه‌فرنگی در سه زیرجمعیت ژنتیکی متمایز قرار گرفتند که با رنگ‌های قرمز، سبز و آبی در نمودار ساختار جمعیت مشخص شده‌اند (شکل ۳). تحلیل ساختار جمعیتی ۳۳ ژنوتیپ گوجه‌فرنگی با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE و روش Evanno et al. (2005a) نشان داد که بهترین تعداد زیرجمعیت‌ها (K) برابر با سه است. با توجه به ضریب عضویت ( $Q \geq 0.75$ )، ژنوتیپ‌ها به سه زیرجمعیت اصلی و تعدادی ژنوتیپ آمیخته تقسیم شدند. زیرجمعیت ۱: ژنوتیپ‌های T1 (۶۵٪)، T2 (۸۵٪)، T3 (۹۵٪)، T4 (۹۰٪)، T7 (۷۵٪)، CH2 (۶۵٪)، CH3 (۷۰٪)، CH4 (۷۵٪) و CH5 (۸۰٪) با بیشترین ضریب عضویت در این زیرجمعیت قرار گرفتند و به عنوان ژنوتیپ‌های خالص (pure) طبقه‌بندی شدند. زیرجمعیت ۲: ژنوتیپ‌های T5، T6، T12، T13، T14، T15، T16، CH6 و CH7 دارای ضریب عضویت بالا نبودند و ستون‌های نمودار STRUCTURE آن‌ها به صورت مخلوط



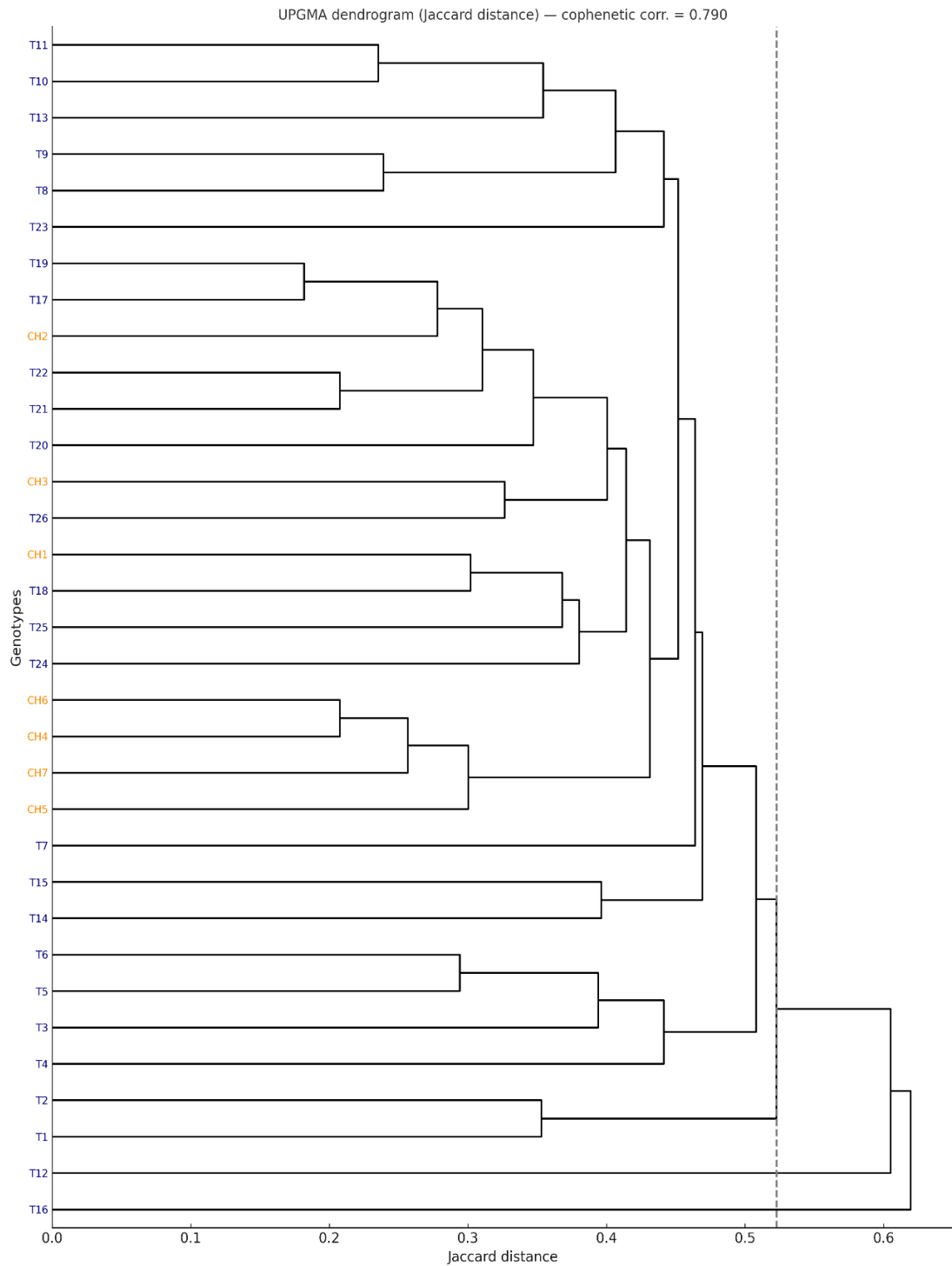
مشاهده شد؛ این ژنوتیپ‌ها آمیخته (admixed) در نظر گرفته شدند. **زیرجمعیت ۳:** ژنوتیپ‌های T17 (۹۰٪)، T18 (۹۰٪) و CH1 (۶۰٪) عمدتاً به این گروه تعلق دارند، در حالی که CH1 به دلیل داشتن کمتر از ۷۵٪ ضریب عضویت، به صورت آمیخته طبقه‌بندی شد. در مجموع، از ۳۳ ژنوتیپ مورد مطالعه، ۱۲ ژنوتیپ (۳۶٪) pure و ۲۱ ژنوتیپ (۶۴٪) admixed بودند یافته‌ها نشان می‌دهند که ۳۶٪ ژنوتیپ‌ها pure و ۶۴٪ ژنوتیپ‌ها admixed هستند و بخش عمده‌ای از ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی مورد مطالعه دارای ترکیب ژنتیکی چند منبعی می‌باشند. درصد بالای ژنوتیپ‌های آمیخته بیانگر جریان ژنی گسترده میان گوجه‌های معمولی و گیلاسی است و نشان می‌دهد که مرزهای ژنتیکی میان این دو نوع در سطح جمعیت‌های مورد بررسی کاملاً مشخص نیست. چنین الگوی آمیختگی احتمالاً ناشی از ترکیبی از جریان ژنی طبیعی و انتخاب مصنوعی در برنامه‌های اصلاحی است و تلاقی‌های کنترل‌شده میان ژنوتیپ‌ها منجر به تبادل آلل شده است. این آمیختگی ژنتیکی نه تنها ظرفیت جمعیت‌ها برای پاسخ به فشارهای محیطی و بیماری‌ها را افزایش می‌دهد، بلکه ژنوتیپ‌های admixed به‌عنوان منابع آلی غنی می‌توانند نقش کلیدی در حفظ و گسترش تنوع ژنتیکی و ایجاد صفات مطلوب در اصلاح نباتات ایفا کنند. در مقابل، ژنوتیپ‌های pure اهمیت بالایی برای برنامه‌های انتخابی دارند، زیرا پایه‌ای مطمئن برای ایجاد خطوط خالص و تولید هیبریدهای پایدار فراهم می‌کنند. ترکیب این داده‌ها نشان می‌دهد که جریان ژنی و آمیختگی ژنتیکی یک عامل کلیدی در شکل‌گیری تنوع ژنتیکی گوجه‌فرنگی است و این الگوهای ژنتیکی پیچیده فرصت‌های ارزشمندی برای برنامه‌های اصلاحی فراهم می‌کنند، در حالی که حفاظت همزمان از ژنوتیپ‌های خالص و آمیخته برای حفظ منابع آلی ضروری است. مطالعات مشابه بر روی گونه‌های گوجه‌فرنگی وحشی و اهلی نشان دادند که جریان ژنی و انتخاب طبیعی و مصنوعی موجب افزایش تنوع و ترکیب ژنتیکی در گونه‌های گوجه‌فرنگی شده است (Zuriaga et al., 2009). همچنین گزارش شده است که تلاقی‌های گسترده میان ژنوتیپ‌های *S. lycopersicum* و *S. pimpinellifolium* منجر به افزایش ترکیب ژنتیکی و شکل‌گیری خرده ساختارهای متنوع شده است (Blanca et al., 2012). در پژوهش حاضر مشاهده شد که ژنوتیپ‌های مورد بررسی فاقد ساختار جغرافیایی مشخص بوده و در قالب سه زیرجمعیت متفاوت اما درهم‌تنیده قرار گرفتند. چنین الگوهایی نشان‌دهنده سهم بالای جریان ژنی و انتقال آلل‌ها در شکل‌گیری تنوع ژنتیکی هستند و اهمیت این فرآیندها را در حفظ و گسترش تنوع ژنتیکی در گوجه‌فرنگی تأیید می‌کنند. نکته مهمی که باید به آن اشاره کرد، تفاوت ظاهری بین نتایج AMOVA و STRUCTURE است. تحلیل AMOVA نشان داد که ۹ درصد از کل تغییرات ژنتیکی مربوط به تفاوت بین دو جمعیت اصلی و ۹۱ درصد مربوط به تنوع درون جمعیتی است. بنابراین در سطح کلان، تنوع ژنتیکی به صورت دو گروه اصلی تبیین شد. با این حال، روش STRUCTURE که حساسیت بیشتری به خرده ساختار ژنتیکی دارد، این دو جمعیت کلی را به سه زیرجمعیت متمایز تفکیک نمود. به عبارت دیگر، نتایج AMOVA بیانگر وجود یک ساختار کلی دوگانه در میان ژنوتیپ‌ها است، در حالی که STRUCTURE نتوانسته است الگوهای ظریف‌تر و پیچیده‌تر توزیع آلی را آشکار کند و سه زیرجمعیت را از هم تفکیک نماید. این تفاوت ناشی از ماهیت روش‌های مورد استفاده است، AMOVA مبتنی بر تجزیه واریانس بوده و عمدتاً تنوع بین و درون گروه‌های تعریف‌شده را می‌سنجد، در حالی که STRUCTURE بر پایه مدل‌های احتمالاتی و الگوریتم بیزین عمل کرده و توانایی بیشتری در آشکارسازی ساختارهای پنهان و خرده‌جمعیت‌های ژنتیکی دارد.



شکل ۳. باریلات تجزیه ساختار داده‌های حاصل از ۱۰ آغازگر ISSR در ژنوتیپ‌های مختلف گوجه‌فرنگی توسط نرم افزار STRUCTURE، اعداد محور افقی و عمودی به ترتیب بیانگر ژنوتیپ و ضریب تعلق هر فرد به هر کلاستر می‌باشد

Figure 3. Bar plot of structural analysis of 10 ISSR primers in different genotypes of date Tomato by STRUCTURE software. The numbers on horizontal and vertical axes correspond to the genotypes and the membership coefficient of each individual, respectively

**تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی:** تحلیل خوشه‌ای ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی بر اساس ضریب شباهت جاکارد و روش UPGMA نشان داد که ۳۳ ژنوتیپ مورد مطالعه در سه گروه اصلی قرار گرفتند (شکل ۴). خط برش در سطحی انتخاب شد که بهترین تفکیک بین ژنوتیپ‌ها را ایجاد می‌کرد و این الگو با نتایج حاصل از STRUCTURE که سه زیرجمعیت ژنتیکی را پیشنهاد داده بود نیز هم‌خوانی داشت. علاوه بر این، ضریب همبستگی کوفنتیک ( $\text{coph. corr.} \approx 0.79$ ) نشان داد که دندروگرام بازتاب مناسبی از داده‌های ماتریس فاصله است و خوشه‌بندی از دقت و اعتبار بالایی برخوردار است. دامنه‌ی ضرایب شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه گسترده بود و نشان‌دهنده وجود تنوع قابل توجه در این مجموعه است. بخش عمده‌ای از ژنوتیپ‌ها (۳۱ نمونه) در یک خوشه‌ی بزرگ قرار گرفتند، در حالی که دو ژنوتیپ (T12) و (T16) هر یک به صورت شاخه‌های منفرد ظاهر شدند. این جدایی نشان‌دهنده‌ی فاصله‌ی ژنتیکی بالای این ارقام نسبت به سایر ژنوتیپ‌هاست. حضور چنین ژنوتیپ‌هایی معمولاً ناشی از آل‌های خاص یا سابقه‌ی اصلاحی متفاوت است و ارزش بالایی در تلاقی‌های دور دارند، زیرا می‌توانند تنوع نو ترکیبی جدیدی به جمعیت وارد کنند (Taranto et al., 2016; Pereira-Dias et al., 2019). درون خوشه اصلی، ژنوتیپ‌های گیلاسی (T19، T28، T29، T30 و T33) گرایش به هم‌خوشه‌ای داشتند و اغلب در شاخه‌های نزدیک قرار گرفتند. این موضوع با انتظار مطابقت دارد، زیرا گیلاسی‌ها از نظر صفات میوه (اندازه کوچک‌تر، میزان قند بالاتر) و سابقه‌ی اصلاحی معمولاً پایه‌ی ژنتیکی محدودتری دارند (Corrado et al., 2013a; Blanca et al. 2015a). با این حال، برخی ژنوتیپ‌های گیلاسی مانند T32 در میان ارقام معمولی خوشه‌بندی شدند؛ این آمیختگی نشان‌دهنده‌ی جریان ژنی و تلاقی‌های اصلاحی میان دو تیپ است. الگوی مشابه در مطالعات (Vargas et al., 2020d) و (Heydari-Tootshami & Salari, 2024) نیز مشاهده شده است که هر دو گزارش کردند ژنوتیپ‌های گیلاسی به دلیل مشارکت مکرر در تلاقی‌های تجاری، ساختار ژنتیکی درهم‌تنیده‌ای با ارقام معمولی دارند.



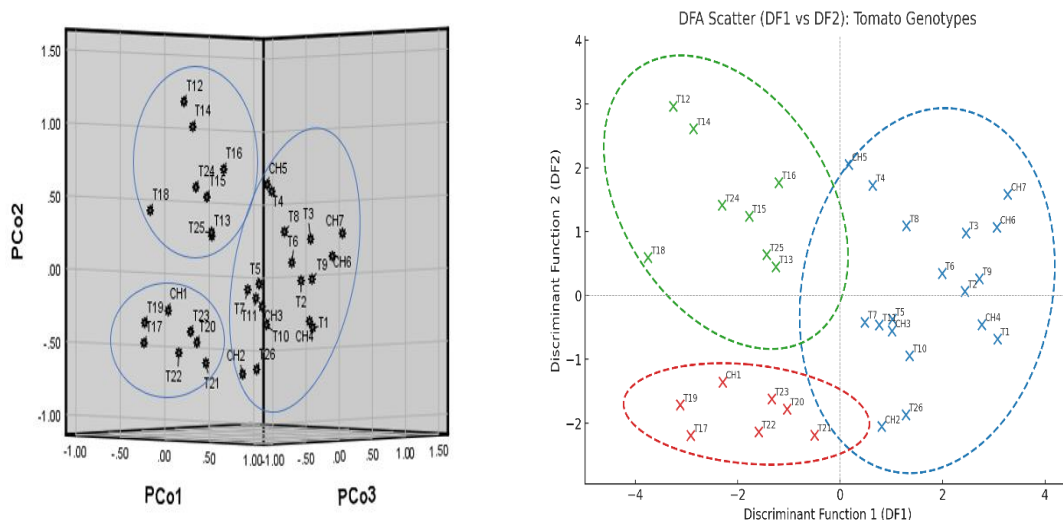
شکل ۴. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای UPGMA بر اساس ضریب شباهت جاکارد در ۳۳ ژنوتیپ گوجه‌فرنگی (TM = آبی، CH = نارنجی)

Figure 4. Dendrogram derived from UPGMA cluster analysis based on Jaccard's similarity coefficient among 33 tomato genotypes (TM = blue, CH = orange)

**تجزیه به مختصات اصلی:** تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) یکی از ابزارهای کارآمد برای نمایش الگوی پراکنش ژنوتیپها در فضای دوبعدی است و امکان بررسی هم‌زمان شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنتیکی را فراهم می‌سازد. در این مطالعه، سه محور نخست PCoA در مجموع ۶۰/۵۰ درصد از تنوع ژنتیکی را تبیین کردند (به ترتیب ۲۳/۸۷، ۱۹/۵۲ و ۱۷/۱۲ درصد) که برای داده‌های ISSR عددی مطلوب محسوب می‌شود و بیانگر بازنمایی مناسب ساختار ژنتیکی ژنوتیپها در ابعاد پایین‌تر است (Mohammadi & Prasanna, 2003) نمودار پراکنش PCo1-PCo2 سه گروه اصلی از ژنوتیپها را نشان داد که هم‌راستا با خوشه‌بندی UPGMA و تحلیل ساختار (Evanno et al., 2005b) بود. در این میان، ژنوتیپ‌های (T12) و (T16) به‌صورت شاخه‌های جداگانه تفکیک شدند و فاصله بیشتری از سایر ژنوتیپها داشتند. این موقعیت ویژه بیانگر ترکیب ژنتیکی منحصر به فرد آن‌ها و پتانسیل بالایشان برای استفاده به‌عنوان والدین در تلاقی‌های دور است، چراکه می‌توانند تنوع نوترکیبی جدیدی را به جمعیت وارد کنند. در مقابل، ژنوتیپ‌های گیلادی (CH) عمدتاً در خوشه‌های نزدیک قرار گرفتند و هم‌پوشانی قابل توجهی با برخی ژنوتیپ‌های معمولی نشان دادند. این امر به‌روشنی بازتاب جریان ژنی و سابقه اهلی‌سازی مشترک میان دو تیپ میوه است، الگویی که در مطالعات مشابه نیز گزارش شده است (Vargas et al.؛ Blanca et al. 2015b؛ Corrado et al. 2013b)؛ Wilks' Lambda = 0.087،  $\chi^2 = 70.80$ ،  $df = 6$ ،  $P < 0.001$ ؛ و برای تابع دوم Wilks' Lambda = 0.421،  $\chi^2 = 25.09$ ،  $df = 2$ ،  $P < 0.001$  و دقت طبقه‌بندی به ۱۰۰٪ رسید. این موضوع نشان می‌دهد که الگوهای چندشکلی آشکار شده توسط ISSR بیانگر تفاوت‌های ژنتیکی واقعی میان گروه‌ها بود. هم‌خوانی نتایج PCoA و DFA با خوشه‌بندی و STRUCTURE نشان‌دهنده قدرت بالای ISSR در شناسایی ساختار ژنتیکی گوجه‌فرنگی است. از دیدگاه اصلاحی، این نتایج بیانگر این مورد است که ژنوتیپ‌های منفرد مانند T16 و T12 می‌توانند به‌عنوان والدین در تلاقی‌های اصلاحی برای افزایش تنوع مورد استفاده قرار گیرند، همچنین ژنوتیپ‌های گیلادی نزدیک به یکدیگر منابع ارزشمندی برای صفات کیفی مانند قند و طعم محسوب می‌شوند و ترکیب والدین از گروه‌های متفاوت می‌تواند مسیر کارآمدی برای تولید نسل‌های با تنوع ژنتیکی بیشتر فراهم سازد. یافته‌های مشابه در دیگر گونه‌های خانواده سولاناسه مانند بادمجان و فلفل نیز تأکید کرده‌اند که ترکیب والدین دور از نظر ژنتیکی، تنوع بیشتری را در نسل‌های بعدی ایجاد می‌کند (Kumar et al.؛ Pereira-Dias et al. 2019؛ Portis et al. 2015)؛ (al., 2020). به‌طور کلی، ترکیب نتایج PCoA و DFA در این مطالعه تصویری جامع از ساختار ژنتیکی ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی فراهم آورد و نشان داد که علی‌رغم تفاوت‌های فنوتیپی آشکار میان گیلادی و معمولی، مرزهای ژنتیکی بین این دو تیپ کاملاً شفاف نیست. این موضوع ظرفیت بالای ژرم‌پلاسم مورد مطالعه را برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی آشکار می‌سازد و اهمیت حفظ هم‌زمان ژنوتیپ‌های خالص و آمیخته را در استراتژی‌های مدیریت منابع ژنتیکی تأیید می‌کند.

**نتیجه‌گیری:** پژوهش حاضر نشان داد که نشانگرهای ISSR با وجود ماهیت غالب خود، قادر به ارائه تصویری روشن از الگوی تنوع ژنتیکی در گوجه‌فرنگی هستند. تحلیل‌های مختلف (PCoA، UPGMA، STRUCTURE، AMOVA) و DFA در یک چارچوب مکمل، وجود تنوع ژنتیکی قابل توجه در میان ژنوتیپ‌ها را تأیید کردند و در عین حال به هم‌پوشانی بالا بین تیپ‌های معمولی و گیلادی اشاره داشتند. چنین الگویی، که پیش‌تر نیز در بررسی‌های تنوع مولکولی اعضای Solanaceae

گزارش شده است، بیانگر نقش پررنگ جریان ژنی و تلاقی‌های مکرر در شکل‌گیری ساختار ژنتیکی این گونه است (Corrado et al., 2013c; Blanca et al., 2015c; Vargas et al., 2020f).



شکل ۵. (a) پراکنش ۳۳ ژنوتیپ گوجه‌فرنگی بر اساس تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) با استفاده از ضریب شباهت جاکارد، (b) نمودار DFA ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی بر اساس DF1 و DF2

Figure 5. (a) Scatter plot of 33 tomato genotypes based on Principal Coordinates Analysis (PCoA) using Jaccard similarity coefficient, (b) DFA plot of tomato genotypes based on DF1 and DF2

از دیدگاه اصلاحی، نتایج به‌روشنی دو مسیر را پیشنهاد می‌کنند: نخست، بهره‌گیری از ژنوتیپ‌های متمایز مانند Maya (T12) و Lucid Gem (T16) به‌عنوان والدین در تلاقی‌های دور به‌منظور گسترش دامنه تنوع نو ترکیب و دوم، استفاده از خوشه‌های نزدیک‌تر به‌ویژه در ژنوتیپ‌های گیلاسی برای تثبیت صفات کیفی میوه. این ترکیب رویکرد «والدین دور و نزدیک» می‌تواند هم به افزایش تنوع ژنتیکی و هم به بهبود صفات زراعی کلیدی منجر شود. به‌طور کلی، یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی گوجه‌فرنگی بیش از آنکه به تمایز جغرافیایی یا تیپ میوه محدود باشد، بازتاب تاریخچه اهلی‌سازی و برنامه‌های اصلاحی اخیر است. بنابراین، ISSR نه تنها به‌عنوان ابزاری اقتصادی و سریع در مطالعات تنوع ژنتیکی ارزشمند است، بلکه می‌تواند به‌عنوان یک سکوی مقدماتی برای انتخاب والدین و طراحی راهبردهای اصلاحی هدفمند مورد استفاده قرار گیرد. این امر، چشم‌انداز روشنی برای بهره‌برداری پایدارتر از ذخایر ژنتیکی گوجه‌فرنگی فراهم می‌آورد.

**سپاسگزاری:** از ریاست محترم پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی پژوهشگاه افسلی‌پور دانشگاه شهید باهنر کرمان به

خاطر حمایت مالی در اجرای پژوهش حاضر سپاس‌گزاری می‌شود.

## منابع

حسینی فاطمه، نیک نژاد آزاده، سرخی‌للهو بهزاد و همکاران (۱۴۰۲) ارزیابی تنوع ژنتیکی گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum L*) مبتنی بر مقایسه کارایی نشانگرهای ISSR و SSR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۵(۲)، ۶۳-۸۲.

حیدری توتشامی زهره، سالاری هومن (۱۴۰۳) بررسی تنوع ژنتیکی ارقام گوجه‌فرنگی با نشانگر ISSR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۶(۱)، ۱۹۴-۱۷۵.

کردکتولی محمد حسین، موسوی زاده سید جواد، مشایخی کامبیز (۱۴۰۳) بررسی نتاج نسل اول برخی توده‌های گوجه‌فرنگی ایران دارای میوه ریز و رشد نامحدود. پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی ۱۶(۲)، ۷۹-۶۷.

نظری مریم، نیک‌بخت اعظم، محمدی‌نژاد قاسم، مهیجی مهدی (۱۴۰۳) برآورد اجزای واریانس فنوتیپی، قابلیت توارث و روابط بین صفات عملکردی میوه و ویژگی‌های فتوسنتزی در گوجه‌فرنگی. مجله ژنتیک و به‌نژادی گیاهی ۱(۲)، ۷۲-۴۷.

## References

- Aguilera, J. G., Pessoni, L. A., Rodrigues, G. B., Elsayed, A. Y., Da Silva, D. J., and De Barros, E. G. (2011). Genetic variability by ISSR markers in tomato (*Solanum lycopersicon* Mill.). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 6(2), 243-252. <https://doi.org/10.5039/agraria.v6i2a998>.
- Ahang, B., Pashapour, S., Ghasemi, A., & Zabihi, A. (2024). Investigating the genetic diversity of several varieties of Iranian tomato (*Solanum lycopersicum*) using RAPD and ISSR molecular markers. *Food Health*, 2024; 6 (4): 18. (In Persian). <https://doi.org/10.53388/FH2024018>.
- Blanca, J., Montero-Pau, J., Sauvage, C., Bauchet, G., Illa, E., Díez, M. J., ... & Cañizares., J. (2015). Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC genomics*, 16(1), 257. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1444-1>.
- Corrado, G., Piffanelli, P., Caramante, M., Coppola, M., & Rao, R. (2013). SNP genotyping reveals genetic diversity between cultivated landraces and contemporary varieties of tomato. *Bmc Genomics*, 14(1), 835. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-835>.
- Díez, M. J., & Nuez, F. (2008). Tomato. *Vegetables II: fabaceae, liliaceae, solanaceae, and umbelliferae*, 249-323. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-74110-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-0-387-74110-9_7).
- Doyle, Ja. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1): 11-15. <https://doi.org/10.12691/jfnr-13-10-1>.
- Eleuch, L., Jilal, A., Grando, S., Ceccarelli, S., von Korff Schmising, M., Tsujimoto, H., ... & Baum, M. (2008). Genetic diversity and association analysis for salinity tolerance, heading date and plant height of barley germplasm using simple sequence repeat markers. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(8), 1004-1014. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00670.x>
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Journal Molecular Ecology*, 14, 2611- 2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>.
- FAO, F. (2021). FAOSTAT statistical database. Rome: Food and Agriculture Organisation of the United Nations (<https://www.fao.org/>).
- Gonias, E. D., Ganopoulos, I., Mellidou, I., Bibi, A. C., Kalivas, A., Mylona, P. V., & Doulis, A. G. (2019). Exploring genetic diversity of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) germplasm of genebank collection employing SSR and SCAR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 66(6), 1295-1309. <https://doi.org/10.1007/s10722-019-00786-6>.
- Haghpanah, M., Kazemitabar, S. K., Hashemi, S. H., & Alavi, S. M. (2016). Comparison of ISSR and AFLP markers in assessing genetic diversity among Nettle (*Urtica dioica* L.) populations. <https://sid.ir/paper/349279/en>

- Henareh, M., Dursun, A., Abdollahi-Mandoulakani, B., Kamil Haliloğlu. (2016). Assessment of genetic diversity in tomato landraces using ISSR markers. *Genetika*, 48(1), 25-35. <https://doi.org/10.2298/GENSR1601025H>.
- Hernandez-Ibanez, L., Sahagun-Castellanos, J., Rodriguez-Perez, JE., Pena-Ortega, MG. (2017). Prediction of fruit yield and firmness of tomato hybrids with BLUP and RR-BLUP using ISSR molecular markers. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 23(1), 21-34. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2016.06.021>.
- Heydari-Tootshami, Z., and Salari, H. (2024). Genetic diversity of tomato's cultivars assessed through ISSR marker. *Agricultural Biotechnology Journal*, 16(1), 175-194. (In Persian). doi: 10.22103/jab.2024.20927.1453
- Hosseini, F., Niknejad, A., Sorkhilaleloo, B. et al. (2023). Valuation of genetic diversity of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) based on the comparison of ISSR and SSR marker efficiency. *Agricultural Biotechnology Journal*, 15(2), 63-82 (In Persian). <https://doi.org/10.22103/jab.2023.20016.1422>.
- Kochieva, EZ., Ryzhova, NN., Khrapalova, IA., Pukhalsky, VA. (2002). Genetic diversity and phylogenetic relationships in the genus *Lycopersicon* (Tourn.) Mill as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis. *Russian Journal of Genetics*, 38, 958-966 <https://doi.org/10.1023/A:1016896013986>.
- Kordkatooli, MH., Mousavizadeh, SJ., & Mashayekhi, K. (2024). The Study of Parents and F1 off Spring from the Crossing of Some Iranian Tomato Accessions. *Journal of Crop Breeding*, 16, 67-79. (In Persian). <https://doi.org/10.61186/jcb.16.2.67>
- Kumar, D., Chhokar, V., Sheoran, S., et al. (2020). Characterization of genetic diversity and population structure in wheat using array-based SNP markers. *Molecular Biology Reports*, 47, 293-306 <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05132-8>.
- Li, Q., Liu, QC., Zhai, H., et al. (2008). Genetic diversity in main parents of sweet potato in China as revealed by ISSR markers. *Acta Agronomica Sinica*, 34, 972-977. [https://doi.org/10.1016/S1875-2780\(08\)60036-X](https://doi.org/10.1016/S1875-2780(08)60036-X).
- Mohammadabadi, MR., Esfandyarpoor, E., Mousapour, A. (2017). Using inter simple sequence repeat multi-loci markers for studying genetic diversity in Kermani sheep. *Journal of Research and Development*, 5, 154-158. <https://doi.org/10.4172/2311-3278.1000154>.
- Mohammadabadi, MR., Oleshko, V., Oleshko, O., et al. (2021). Using inter simple sequence repeat multi-loci markers for studying genetic diversity in guppy fish. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 21, 603-613. [http://doi.org/10.4194/1303-2712-v21\\_12\\_03](http://doi.org/10.4194/1303-2712-v21_12_03).
- Mohammadi, SA., Prasanna, BM. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants salient statistical tools and considerations. *Crop science*, 43(4), 1235-1248. <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.1235>
- Nazari, M., Nikbakht Dehkordi, A., Mohammadi-Nejad, G., Ghotbzadeh-Kermani, S., and Mohayjeji, M. (2024). Estimation of Phenotypic Variance Components, Heritability, and Relationships Between Fruit Yield Traits and Photosynthetic Characteristics in Tomato. *Genetics and Plant Breeding*, 1(2), 47-72. (In Persian). <https://doi.org/10.22103/gpb.2025.24271.1015>.

- Peakall, R., Smouse, P. (2012). GenAIEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Jornal Bioinform*, 1, 6-8. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>.
- Peakall, R., Smouse, PE. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology*, 6, 288–295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>.
- Pereira-Dias, L., Vilanova, S., Fita, A., Prohens, J., & Rodríguez-Burruezo, A. (2019). Genetic diversity, population structure, and relationships in a collection of pepper (*Capsicum* spp.) landraces from the Spanish centre of diversity revealed by genotyping-by-sequencing (GBS). *Horticulture research*, 6. <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0132-8>
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., et al. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSRP (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2, 225- 238. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00564200>.
- Pravitha, M., Dipika Agrahar, M., Ajesh Kumar, V., Recent developments in tomato drying techniques: A comprehensive review. *Journal of Food Process Engineering*, 2024;47(2). Available at: <http://doi.org/10.1111/jfpe.14550>
- Sarwat, M. ISSR (2012) : a reliable and cost-effective technique for detection of DNA polymorphism. *Methods in Molecular Biology*, 2012;862:103-21. [http://doi.org/10.1007/978-1-61779-609-8\\_9](http://doi.org/10.1007/978-1-61779-609-8_9).
- Taranto, F., D’Agostino, N., Greco, B., Cardi, T., & Tripodi, P. (2016). Genome-wide SNP discovery and population structure analysis in pepper (*Capsicum annuum*) using genotyping by sequencing. *BMC genomics*, 17(1), 943. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3297-7>
- Tikunov, YM., Khrustaleva, L.I., Karlov, GI. (2003). Application of ISSR markers in the genus *Lycopersicon*. *Euphytica*, 131, 71-81. <https://doi.org/10.1023/A:1023090318492>.
- Tomer, A., & Diwivedi, S. (2020). A review on Early blight of Tomato menacing disease caused by *Alternaria solani*. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, 7, 2328-2334 <https://doi.org/10.31080/ASAG.2020.04.0908>
- Vargas, JEE., Aguirre, NC., Coronado, YM. (2020). Study of the genetic diversity of tomato (*Solanum* spp) with ISSR markers. *Revista Ceres*, 67, 199-206 <https://doi.org/10.1590/0034-737X202067030005>.
- Zarrabian, M., Ehtemam, M. H., Majidi, M. M., & Dehkordi, A. N. (2025). Assessment of the relationship between *Onobrychis* species through morphological and molecular perspectives. *Journal of Rangeland Science*, 15(1), 1-11. <https://doi.org/10.57647/j.jrs.2025.1501.07>
- Zietkiewicz, Ewa., Rafalski, A., Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomic*, 20, 176-183. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>.
- Zuriaga, E., Blanca, J., & Nuez, F. (2009). Classification and phylogenetic relationships in *Solanum* section *Lycopersicon* based on AFLP and two nuclear gene sequences. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56(5), 663-678. <https://doi.org/10.1007/s10722-008-9392-0>.